

DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**A SZELENOFOSZFÁT BIOSZINTÉZISE ÉS A
SZELÉNATOM BEÉPÜLÉSE A SEJTEK
MAKROMOLEKULÁIBA**

VERES ZSUZSA

MTA KÉMIAI KUTATÓKÖZPONT, KÉMIAI INTÉZET

BUDAPEST

2001

BEVEZETÉS

A szelént, aminek elnevezése a görög hold szóból származik Berzelius fedezte fel az ezernyolcszázas évek elején. A nyomelemek közé tartozó szelénről már 1954-ben kimutatták, hogy a katalitikus aktivitással rendelkező hangyasav dehidrogenáz enzim szintéziséhez jelenléte elengedhetetlen az *Escherichia coli* baktériumban, de nagyobb figyelmet csak néhány év múlva kapott, amikor ismertté vált, hogy az emlősök számára is létfontosságú.

Az azóta évről évre bővülő irodalmi ismeretek szerint körülbelül 20 eukariota és több mint 15 prokariota eredetű szelenoproteint tartanak számon, melyek többsége redox reakciókat katalizál. A humán vonatkozású felfedezések közül kiemelkedik, hogy 1972-ben egy fontos, szinte minden sejttípusban megtalálható antioxidáns enzimről, a glutation peroxidázról kimutatták, hogy szeleno-enzim. Néhány év elteltével sikerült azonosítani a fehérjében lévő szelén tartalmú vegyületet, a szelenociszteint, ami így huszonegyedikként bekerült a fehérjeépítő aminosavak sorába. A ma ismert glutation peroxidázok közül négy tartalmaz szelenociszteint. A későbbi felismerések, hogy az I-, II-, és III-as típusba sorolt jódtironin 5'-dejodinázok szintén szelenociszteint tartalmazó enzimek azért jelentősek, mert rámutattak a prohormon aktív tiroid hormonná alakítása, illetve a hormon inaktiválása útján a szelén nyomelemnek a növekedési és fejlődési folyamatokban betöltött szerepére. Az említett fehérjék génsebészeti technikával előállított cisztein analógjainak katalitikus aktivitása nagyságrendekkel kisebb, mint az eredeti, szelenociszteint tartalmazó enzimeké. Néhány évvel ezelőtt derült fény arra, hogy egy újabb, a sejt redox állapotának szabályozásában részt vevő enzim, a tioredoxin reduktáz is tartalmaz szelenociszteint a molekula C-terminális szakaszán található redox-centrumban. E felismerés jelentőségét tovább növeli, hogy redukált tioredoxin nélkül a DNS szintézis folyamatában is zavar keletkezhet, ha dezoxiribonukleotid hiány lép fel. A szelenocisztein specifikus alkilezése a tioredoxin reduktáz inaktiválódásához vezet, ez esetben is igazolva a szelén fontosságát a sejt számára a túlélést elősegítő katalitikus reakciókban.

A szelenoprotein expresszióban bekövetkező zavarok patológiás állapotot hozhatnak létre. Szelén deficienciára vezethető vissza a Keshan és a Kashin-Beck betegség, és összefüggésbe hozható vele az arteriosclerosis és bizonyos tumorok kialakulása is. A prokariota és eukariota szervezetek egyre növekvő számú fehérjemolekuláiban kimutatott szelenociszteinen kívül jó néhány prokariota tartalmaz szelént egyes tRNS molekuláinak antikodon régiójában is, 5-szubsztituált-2-szelenouridin formájában, bár ennek jelentősége még nem tisztázódott teljesen.

Számomra 1989 és 1994 között nyílt lehetőség arra, hogy részt vegyek olyan kutatásokban, melyek során az említett szelén tartalmú makromolekulák bioszintéziséhez nélkülözhetetlen szelén donor vegyületet sikerült azonosítani, és a vegyületet szintetizáló enzim néhány sajátosságát felderíteni. Az azóta eltelt évek során arra is fény derült, hogy az általunk prokariota szervezetek vizsgálata alapján monoszelenofoszfátként azonosított szelén donor vegyület és a szintézisét katalizáló szelenofoszfát szintetáz enzim jelenléte nem korlátozódik a prokariotákra, hanem megtalálhatóak az emlős, így a humán sejtekben is. Úgy tűnik tehát, hogy a szelenofoszfát általános szelén donor szerepet tölt be a biológiai rendszerekben.

Munkánk közvetlen előzménye volt, hogy az August Böck (University of München) vezette kutatócsoport kimutatta, hogy a szelenocisztein fehérjébe épüléséhez egy speciális tRNS-en és elongációs faktoron kívül szükség van két új, addig ismeretlen enzimre is. Ezek közül az enzimek közül az egyiket *Escherichia coli*-ban a *seld* gén határozza meg. A gén terméke egy, a génszekvencia alapján 347 aminosavból álló fehérjemolekula, amit SELD-nek jelöltek. E fehérjéről vizsgálataink során elsőként mi bizonyítottuk, hogy egy olyan enzim, aminek reakcióterméke a szelenofoszfát, és hogy ez a reaktív vegyület szolgál szelén donorként két, biokémiailag eltérő folyamatban. Ezek egyikében a szelén mint a szelenocisztein alkotóeleme specifikusan beépül a fehérjemolekulákba, míg a másik folyamat eredményeként bizonyos tRNS molekulákban jelenik meg a kénatomot helyettesítve az 5-metilaminometil-2-tiouridin minor-bázisban.

KÍSÉRLETI EREDMÉNYEK

1. A szelénatom beépülése bakteriális tRNS 5-metilaminometil-2-tiouridin minorbázisának kénatomja helyére in vitro [⁷⁵Se]szelenit jelenlétében

Escherichia coli és *Salmonella typhimurium* esetében is izoláltak olyan mutánsokat (fdhB és selA1), melyeknél nem mutatható ki a szelén specifikus beépülése sem a fehérjékbe, sem a tRNS molekulákba. Mindkét baktériumban a SELD gént találták funkcióképtelennek, amely a vad típusú baktériumok esetében a SELD fehérje szintézisét biztosítja. A fenti ismeretek alapján két kérdés is felmerült, amit szerettünk volna megválaszolni. Az egyik kérdés az volt, hogy milyen módon teszi lehetővé a SELD fehérje a szelenocisztein UGA (opal) kodon irányította beépülését fehérjékbe, a másik kérdés pedig az volt, hogy vajon a lizin, glutaminsav és glutamin akceptor tRNS molekulákban kimutatott 5-szubsztituált-2-szelenouridin megjelenését is elősegíti-e a SELD fehérje, vagyis összekötő kapocsként szolgál-e az említett, egymástól eltérő folyamatok között.

Salmonella typhimurium és *Methanococcus vannieli* baktériumokból készült teljes homogenizátumokkal nyert adataink szerint a ⁷⁵Se atom tRNS-be épülése nagy fajlagos aktivitású (1000 Ci/mmól) [⁷⁵Se]-szelenit alkalmazásával *in vitro* is kimutatható volt, és sebessége függött a nem radioaktív szelenit mennyiségétől. O-acetil-L-szerin, a szelenocisztein prekursora, koncentrációjától függően növelte a beépült szelén mennyiségét. L-szelenocisztein jelenléte csökkentette, a D-szelenocisztein viszont nem befolyásolta a ⁷⁵Se atom beépülésének mértékét. A kapott adatok felvetik annak lehetőségét, hogy *in vivo* az L-szelenocisztein is szolgálhat szelén forrásként. A reakcióelegy kiegészítése ATP-vel növelte, míg az α,β -, és β,γ -metilén-ATP adása csökkentette a ⁷⁵Se atom tRNS-be épülésének mértékét, ami egyrészt arra utal, hogy a folyamat ATP-t igényel, másrészt arra, hogy a sejtpreparátumok tartalmaztak endogén ATP-t. A ⁷⁵Se atom beépülése a tRNS frakcióba a teljes homogenizátum felülúszójával is kimutatható volt, ami a folyamatban részt vevő enzimek körét a szolubilis enzimekre szűkítette. A ⁷⁵Se tartalmú tRNS emésztését követő HPLC vizsgálat kimutatta, hogy a radioaktív szelénatom az 5-metilaminometil-2-szelenouridin alkotórésze, ahogyan azt előzőleg *in vivo* igazolták.

2. A SELD fehérje szerepe a kén-szelén szubsztitúciós reakcióban

A ^{75}Se atom tRNS-be épülésének *in vitro* nyomon követhetősége lehetővé tette azt, hogy a SELD fehérje szerepét vizsgálhassuk a kén-szelén szubsztitúciós reakcióban. A *Salmonella typhimurium* Sela1 mutánsa *in vivo* nem képes szelénatomot beépíteni tRNS molekuláiba. A tisztított SELD fehérje, valamint ATP és radioaktív szelenid jelenléte viszont lehetővé tette, hogy a mutánsból származó durva enzimpreparátum *in vitro* beépítse a ^{75}Se atomot a hozzáadott, homológ tRNS szubsztrátba. A Sela1 mutánsból származó durva enzimpreparátum nélkül a SELD mint egyedüli enzim nem katalizálta a szelénatom beépülését a tRNS szubsztrátba. Az eredmény azt igazolta, hogy a SELD fehérje nemcsak a szelénatom fehérjékbe épülését, de a tRNS-be való beépülését is elősegíti, tehát közös tényezőként szerepel a két folyamatban. E megfigyelés legegyszerűbb magyarázatának az látszott, hogy a SELD fehérje egy olyan enzim, ami mindkét folyamatban felhasználható szelén donor molekulát szintetizál, ahogyan ezt ^{31}P NMR spektroszkópia segítségével sikerült is később bizonyítanunk.

Az a megfigyelés, hogy a tRNS módosítása szelénatommal ATP igényes folyamat arra utalt, hogy a SELD fehérje szerepének megértéséhez a kulcsot az ATP és a szelenid között végbemenő reakció adhatja, amit valószínűleg a SELD fehérje katalizál. A reakció végtermékeinek egyikét [^{14}C]ATP szubsztrát alkalmazásával AMP-ként azonosítottuk. A SELD enzim katalizálta ATP bontás magnéziumion-függést mutatott, csak -2-es oxidációs állapotú szelén (szelenid) jelenlétében ment végbe, és AMP gátolta a reakciót. Miután a SELD enzim katalizálta reakcióban, anaerob körülmények között, csak szelenid jelenlétében alakult az ATP AMP-vé, valószínűnek tűnt a feltételezés, hogy a reakció másik terméke egy P-Se kötést tartalmazó molekula lehet. A szelénatomot tartalmazó termékről a teljes reakcióelegy oxigéntől mentes körülmények között végzett ^{31}P NMR spektroszkópiás vizsgálata adott felvilágosítást. A spektrum tartalmazta a szubsztrát ATP-re és a már azonosított AMP termékre jellemző rezonancia jeleket, de ezen kívül ortofoszfát és egy ismeretlen, foszforatomot tartalmazó vegyület jelenlétét is bizonyította. Az ismeretlen molekula bomlékonyságára utalt, hogy a levegő oxigénjének kitett reakcióelegy ^{31}P NMR spektrumából eltűnt az előtte 23,2 ppm-nél észlelt rezonancia jel. Azt,

hogy az ismeretlen termék valóban tartalmaz szelénatomot, amit a ^{31}P kémiai eltolódás értéke valószínűsített, ^{77}Se stabil izotópban dúsított Na^{77}SeH alkalmazásával sikerült igazolni. A spin csatolás mértéke szelén-foszfor kötés jelenlétét bizonyította, tehát azt, hogy a SELD enzim katalizálta reakció szelén tartalmú terméke szelenofoszfát. Ennek a reaktív, redukált szelénvegyületnek a jelenlétét biológiai rendszerben mi mutattuk ki elsőként.

3. A SELD enzim katalizálta reakció szelénatomot tartalmazó termékének azonosítása, ami lehetővé tette a SELD fehérje szelenofoszfát szintetázként való meghatározását

A kémiai szintézis útján előállított, autentikus monoszelenofoszfát és a SELD enzim katalizálta reakcióban keletkezett szelenofoszfát azonosságát a következő eredmények igazolták: a ^{31}P NMR spektroszkópiával detektált kémiai eltolódásuk pH függése azonosnak adódott; ^{31}P kémiai eltolódás értékük és a ^{31}P - ^{77}Se kapcsolási állandójuk értéke is megegyezett; retenciós idejük fordított fázisú oszlopon, HPLC módszerrel alkalmazva szintén azonos volt. Az enzimatikusan előállított szelenofoszfát és az autentikus monoszelenofoszfát fizikai-kémiai sajátosságain alapuló azonosságát a biokémiai vizsgálatok is alátámasztották. A *Salmonella typhimurium* Sela1 mutáns baktérium homogenizátumából készült enzimpreparátum a hozzáadott, tisztított SELD enzim hatására ATP és ^{75}Se szelenid jelenlétében képessé vált ^{75}Se atomot építeni 5-metilaminometil-2-szelenouridin formájában a tRNS frakciójába. Autentikus monoszelenofoszfát hozzáadása a reakcióelegyhez koncentrációjától függően gátolta a radioaktív szelénatom beépülését a tRNS-be. A reakcióban keletkezett ^{14}C AMP mennyiségét 0,5 mM monoszelenofoszfát nem befolyásolta, míg a ^{75}Se atom tRNS-be épülését 95 %-kal csökkentette. A fenti vizsgálatok alapján igazoltuk, hogy a SELD enzim katalizálta reakcióban képződő szelenofoszfát megegyezik az autentikus monoszelenofoszfáttal, és így a SELD enzim szelenofoszfát szintetázként sikerült azonosítanunk.

4. A szelénatom tRNS molekulába épülésének további vizsgálata szelenofoszfát szubsztrát alkalmazásával

A következőkben azt vizsgáltuk, hogy a szelenofoszfát egyedüli szubsztrátként elegendő-e a tRNS molekulában lezajló kén-szelén

szubsztitúcióhoz. Ehhez egyrészt [^{75}Se]szelenid és ATP mentes [^{75}Se]szelenofoszfátra volt szükség, másrészt pedig a *Salmonella typhimurium* SelA1 törzséből készült enzimpreparátum tisztítására. A kromatográfiás módszerekkel megtisztított [^{75}Se]szelenofoszfát a *Salmonella typhimurium* SelA1 mutánsából készült, részlegesen tisztított enzimpreparátum jelenlétében lehetővé tette a ^{75}Se atom tRNS-be épülését ugyanúgy, ahogy azt a szelenofoszfát szintetáz és szubsztrátjainak az ATP-nek és a szelenidnek jelenlétében előzőleg kimutattuk. A tRNS módosítását katalizáló, részlegesen tisztított enzimpreparátumon kívül csak szelenofoszfátot tartalmazó reakcióelegybe inaktív szelenidet juttatva, az nem csökkentette a ^{75}Se beépülésének mértékét, ellentétben a kémiai szintézis útján nyert szelenofoszfáttal. Ez alátámasztotta, hogy a tRNS módosítását katalizáló enzim szubsztrátja a szelenofoszfát. Az adatok arra is utaltak, hogy a szelén beépülése az 5-metilaminometil-2-tiouridin molekulába a kénatom helyére nem igényel ATP-t. Ezt a feltételezést a SelA1 mutánsból nyert enzimpreparátum további tisztítása után bizonyítottuk, hiszen a durva enzimpreparátum szennyezésként esetleg tartalmazhatott ATP-t. A tisztítási folyamat utolsó három lépésében kapott enzimpreparátumokat felhasználva megvizsgáltuk a szelénatom tRNS-be épülésének ATP igényét. [^{75}Se]Szelenofoszfát mint szelén donor szubsztrát jelenlétében a tRNS módosítása ATP hozzáadása nélkül is végbement, és a folyamatot még nagy koncentrációban (10 mM) sem gátolta β,γ -metilén-ATP. Ez az eredmény arra utal, hogy a szelenofoszfát közvetlen módon támadja meg az 5-metilaminometil-2-tiouridin 2-es szénatomját, és a szelén addíciójával együtt a kénatom eliminációja is megtörténik. A kezdeti kísérletekben észlelt ATP igény tehát csak a szelenofoszfát szintézisének ATP függését tükrözte.

5. A szelenofoszfát szintetáz enzim és a katalitikus reakció tanulmányozása

A tiszta szelenofoszfát szintetáz specifikus aktivitása 83 nmól/mg x perc-nek, K_m értéke ATP-re 0,9 mM-nak, míg szelenidre a látszólagos K_m érték 7,3 μM -nak adódott. Többféle természetes nukleozid trifoszfátot, pirofoszfátot vagy polifoszfátot alkalmazva szubsztrátként, a kapott adatok arra utaltak, hogy az enzim specifikus ATP-re. ATP szubsztrát jelenlétében több természetes purin-, és pirimidin-

nukleozid trifoszfát, illetve monofoszfát hatását tanulmányoztuk a szelenofoszfát szintetáz katalizálta reakcióra, és megállapítottuk, hogy gátló hatásuk kisebb 10 %-nál. Az egyetlen kivétel az AMP volt, ami kompetitív gátlónak bizonyult.

A két vegyértékű kationok vonatkozásában megállapítható, hogy a szelenofoszfát szintetáz aktivitása függ a magnéziumionok jelenlététől, amit sem mangán-, sem kobaltionok nem helyettesítenek. A katalitikus reakciót mangán-, és cinkionok is gátolták. Egy vegyértékű kationok jelenléte szintén esszenciális feltétele az enzim működésének. A legnagyobb enzimaktivitás káliumionok adása után mérhető, de ammónium-, és rubídiumionok is elősegítik az enzimreakciót, ellentétben a lítium-, és nátriumionokkal, melyek káliumionok jelenlétében gátolják a szelenofoszfát szintetáz katalizálta reakciót.

A szelenofoszfát szintetáz stabilitására vonatkozó vizsgálatokból megállapítható, hogy az enzim -80 °C-on több évig tárolható aktivitás veszteség nélkül. A fehérje 10 mg/ml töménységű oldatának aerob körülmények között végzett 5 perces hőkezelése (50-60 °C) sem okozott mérhető aktivitás csökkenést. Oxigén átáramoltatása a fehérje-oldaton szintén nem változtatta meg az aktivitást. Hidrogén-peroxid kezelés ellenben az enzim aktivitásának csökkenéséhez vezetett.

6. A katalitikus reakció szempontjából lényeges aminosavmaradékok vizsgálata mutáns szelenofoszfát szintetáz enzimek segítségével

A szelenofoszfát szintetáz enzim génjének szekvenciája alapján a termék egy 347 aminosavból álló, 37 kDa tömegű fehérje, ami 7 ciszteint is tartalmaz. Ezek közül kettő a molekula N-terminális végéhez közel található. A két ciszteint tartalmazó szekvencia (H¹³GAGCGCK) hasonlít a több ATP-kötő fehérjében is fellelhető, konzervált ATP-kötő szekvenciához. E megfigyelés és a jóacetamid inaktiváló hatása alapján érdekesnek ígérkezett az említett szekvencia és a benne található ciszteinmaradékok szerepének vizsgálata a katalitikus reakcióban. Ennek lehetőségét I.Y. Kim kollégám teremtette meg, aki a kérdéses génszekvenciában pontmutációkat alkalmazva, olyan módosított enzimeket hozott létre, melyek csak egy-egy vagy egyszerre két aminosavban is különböztek az *Escherichia coli* eredeti szelenofoszfát szintetázától. Az *in vitro* enzimaktivitási vizsgálatok, melyekben a [¹⁴C]ATP és szelenid szubsztrátok jelenlétében keletkező

[¹⁴C]AMP mennyiségét mértük azt mutatták, hogy a 19-es cisztein helyett szerint, és a 13-as helyzetű hisztidin helyett aszparagint tartalmazó mutánsok enzimaktivitása megegyezett a módosítatlan szelenofoszfát szintetázéval. A 18-as glicin helyett valint tartalmazó enzim aktivitása kb. 70 %-kal csökkent, a 20-as helyzetű lizin helyett arginint tartalmazó fehérje aktivitása a kimutathatósági határ közelében volt, a 20-as pozíciójú lizin helyett a neutrális glutamint tartalmazó mutáns enzim és a 17-es cisztein helyett szerint tartalmazó molekula pedig teljesen inaktívnak mutatkozott. A módosított enzimekkel végzett kísérletek eredményei alapján a szelenofoszfát képződése szempontjából a 17-es pozíciójú cisztein és a 20-as helyzetű lizin is lényegesnek bizonyult. A V_{\max} értékek nem mutattak lényeges eltérést a vad törzsből izolált enzimmal kapott értéktől. A K_m érték a 19-es cisztein helyett szerint, és a 13-as hisztidin helyett aszparagint tartalmazó fehérjéknél kismértékben, míg a 18-as glicin helyett valint tartalmazó mutáns enzimmél kb. négyszeresre nőtt. A katalitikus aktivitással rendelkező mutáns fehérjék esetében a reakció termékei megegyeztek a módosítatlan enzimmal kimutatott termékekkel, amit a ³¹P NMR spektroszkópiai vizsgálatok igazoltak.

A 17-es és 19-es helyzetű ciszteinek esetleges szerepét az ATP kötődésében 8-azido-ATP segítségével vizsgáltuk. A 8-azido-ATP fénytől elzárt reakcióelegyben koncentrációjától függően csökkentette a szintetáz katalizálta reakcióban képződő AMP mennyiségét. Figyelembe véve, hogy az enzimkinetikai mérések alapján ez a molekula kompetitív gátlónak bizonyult, vagyis képes volt elfoglalni az ATP kötőhelyet, érdemesnek tűnt 8-azido- γ -[³²P]ATP-vel elvégezni a fotoaffinitás-jelölési kísérletet, hogy a módosított enzimek ATP kötéséről információt nyerjünk. A módosítatlan enzim radioaktív jelölődésének mértékét inaktív ATP csökkentette, ami az ATP kötőhely részvételét mutatta a radioaktív ATP analóggal történt reakció során is. A vad típusú és a mutáns baktériumokból tisztított szelenofoszfát szintetáz enzimeket ezzel a technikával összehasonlítva azt tapasztaltuk, hogy a 17-es vagy 19-es helyzetű cisztein helyett szerint tartalmazó molekulákba csak kisebb mértékben épült be a radioaktív jelzés, míg a kettős mutánsból nyert enzimen egyáltalán nem volt kimutatható radioaktivitás. Az eredmények arra is utaltak, hogy a vad típusú és a többi, nem cisztein mutáns baktériumból

tisztított szelenofoszfát szintetáz enzimben a kovalens módosulás mértéke hasonló. A 20-as helyzetben lizin helyett glutamint tartalmazó fehérjemolekula jelölődése azt mutatta, hogy e pozícióban nem szükséges bázikus aminosav jelenléte a 8-azido-ATP kötődéséhez. A fotoaffinitás-jelölési kísérletek eredményei összhangban vannak azzal az elképzeléssel, hogy a szelenofoszfát szintetázban a 17-es és 19-es ciszteinek szerepet játszhatnak az ATP szubsztrát megkötésében, míg a 20-as lizin valószínűleg az ATP kötődése után, a katalitikus reakció későbbi szakaszában játszik lényeges szerepet.

7. A szelenofoszfát szintetáz katalizálta reakció sztöchiometriájának tanulmányozása

Ahogy azt a ^{31}P NMR spektroszkópiai vizsgálatok is mutatták, a szelenofoszfát szintetáz katalizálta reakcióban ATP és szelenid szubsztrátokból AMP, ortofoszfát és szelenofoszfát termékek képződnek. Radioaktív szubsztrátok alkalmazásával egy gyors módszert dolgoztunk ki a keletkezett termékek mennyiségének pontos mérésére. Folyamatos argon áramoltatás közben inkubáltuk a szelenofoszfát szintetázt Na^{75}SeH és $[^{14}\text{C}]\text{ATP}$ szubsztrátokkal, majd a reakcióelegy egy részét vékonyréteg lapon, levegőn kromatografáltuk, a másik részét pedig géliszűrésnek vetettük alá anaerob körülmények között. A vékonyréteg lapra felcseppentett reakcióelegyben a képződött $[^{75}\text{Se}]\text{szelenofoszfát}$ szelén komponense elemi szelénre oxidálódva a felcsöppentés helyén maradt, így elválasztható volt a $[^{14}\text{C}]\text{AMP}$ terméktől, aminek mennyiségét a kromatográfiát követően folyadékszcintillációs méréssel meghatároztuk. A géliszűrés eredményeként a $[^{75}\text{Se}]\text{szelenofoszfát}$ termék és a Na^{75}SeH szubsztrát feleslege egymástól elválasztható volt, majd ezután a $[^{75}\text{Se}]\text{-szelenofoszfát}$ mennyisége γ számlálóval mérhető. A fenti kromatográfiás módszerekkel $2,2\ \mu\text{mol}$ AMP és $2,2\ \mu\text{mol}$ szelenofoszfát keletkezését mutattuk ki, ami igazolta a ^{31}P NMR spektroszkópiai vizsgálatok alapján valószínűsített 1:1:1 arányú termékképződést. $\gamma\text{-}[^{32}\text{P}]\text{ATP}$ -vel és $[^{75}\text{Se}]\text{-szelenofoszfáttal}$ végzett kísérleteink arra utaltak, hogy a szelenofoszfátba az ATP γ helyzetű foszfát csoportja épül be.

AZ ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

1. A *Salmonella typhimurium* és a *Methanococcus vannielii* különféle izoakceptor tRNS molekuláinak antikodon régiójában megtalálható 5-metilaminometil-2-tiouridin minorbázis kénatomjának specifikus cseréje szelénatomra ATP-t igénylő folyamat, ami a baktériumból készült teljes homogenizátumban *in vitro* is végbemegy szelenit jelenlétében, több enzim közreműködésével.

2. A *Salmonella typhimurium* SelA1 mutánsából készült homogenizátumban a fenti kén-szelén szubsztitúciós reakció csak abban az esetben zajlik le, ha az *in vitro* rendszer kiegészül a vad típusú baktériumból izolált SELD fehérjével.

3. A SELD fehérje egy olyan enzim, ami ATP-t használ fel egy reaktív, Se-P kötést tartalmazó szelén donor vegyület szintéziséhez.

4. A SELD enzim katalizálta reakcióban képződő szelénvegyület azonos a monoszelenofoszfáttal, így a SELD enzim szelenofoszfát szintetázként azonosítható.

5. Szelenofoszfát mint egyedüli szelén donor jelenlétében a szelénatom tRNS-be épülése sem szelenofoszfát szintetázt, sem ATP-t nem igényel többé. Szükség van ellenben egy másik enzimre és 5-metilaminometil-2-tiouridin minorbázist tartalmazó tRNS szubsztrátra, melynek 3'-adenozil vége nem tűnik lényegesnek a S-Se csere-reakció szempontjából. A reakciót katalizáló enzim jóacetamiddal történő alkilezés hatására inaktíválódik, ami a szulfhidril csoport(ok) szerepére utal a folyamatban.

6. Az *Escherichia coli*ból származó szelenofoszfát szintetázról szerzett ismeretek alapján az enzim:

a., Monomer, specifikus az ATP szubsztrátra ($K_m = 0,9$ mM), és a szelenidre (a reakció csak -2-es oxidációs állapotú szelén esetén megy végbe).

b., A reakció termékei az AMP, az ortofoszfát és a monoszelenofoszfát, aminek foszfát csoportja az ATP γ helyzetű foszfát csoportjából származik.

c., Az AMP, az ortofoszfát és a szelenofoszfát termékek 1:1:1 arányban keletkeznek az enzimreakció folyamán.

d., A reakció termékei közül a szelenofoszfát és az ortofoszfát nem befolyásolják szignifikánsan a katalízis sebességét, míg az AMP kompetitív gátlónak ($K_i = 170 \mu\text{M}$) bizonyult.

e., A katalitikus reakció során enzim-pirofoszfát intermedier képződése nem mutatható ki.

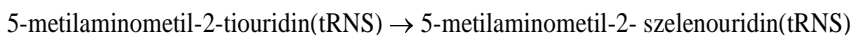
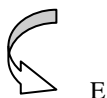
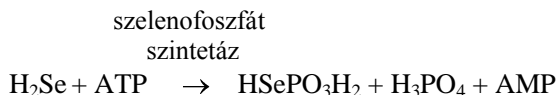
f., A szelenofoszfát szintetáz reakció magnéziumiont igényel, amit a mangán és a kobalt két vegyértékű kationjai nem helyettesítenek. Magnéziumion jelenlétében a mangán-, és a cinkionok is gátolják a katalízist.

g., Egy vegyértékű kation: $\text{K}^+ > \text{NH}_4^+ > \text{Rb}^+$ jelenléte is elengedhetetlen feltétele az enzim működésének. Li^+ és Na^+ nem aktiválják a szintetázt, de K^+ jelenlétében gátolják azt.

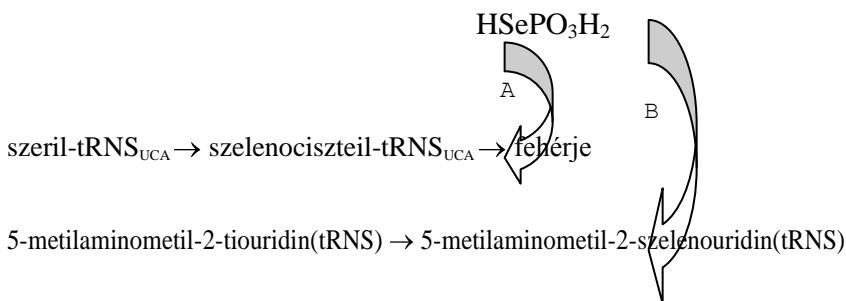
h., A szelenofoszfát szintetáz nem érzékeny enyhe hőkezelésre, és az oxigén jelenlétére sem, de H_2O_2 gátolja a működését. Jódacetamiddal végzett alkilezés inaktíválja, és ezt az ATP szubsztrát vagy vizsgált analógja nem képes befolyásolni.

i., A szelenofoszfát szintetáz molekula 17-es és 19-es helyzetű cisztein aminosavmaradékai szerepet játszanak az enzim 8-azido-ATP-vel történő derivatizációjában, ami az ATP szubsztrát kötésében játszott szerepükre utal. A 20-as helyzetben található lizin pedig az ATP kötődését követő szakaszban nélkülözhetetlen az enzim működése szempontjából. Cseréje argininre aktivitás csökkenést, neutrális jellegű glutaminra pedig inaktíválódást eredményez.

A szelenofoszfát szintetázal és a katalitikus reakció során keletkező szelén donor vegyülettel, a monoszelenofoszfáttal végzett kísérleteink legfontosabb eredményeit folyamatábrákkal összegezve :



Eredményeink alapján a szelenofoszfát mint általános biológiai szelén donor vegyület köti össze azt a két folyamatot, amelyek egyikében (A) a szelénatom a szelenocisztein alkotóelemeként beépül a fehérjékbe, a másik folyamat (B) során pedig minorbázis komponensként tRNS molekulákban jelenik meg. (A szelén fehérjemolekulákba épülésének mechanizmusát az August Böck vezette kutatócsoport derítette fel).



A TÉZISEK TÉMAKÖRÉBEN MEGJELENT KÖZLEMÉNYEK

1. **In vitro incorporation of selenium into tRNAs of *Salmonella typhimurium*.**
Veres, Z., Tsai, L., Politino, M., and Stadtman, T.C. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 6341-6344.
2. **Biosynthesis of selenium-modified tRNAs in *Methanococcus vannielii*.**
Politino, M., Tsai, L., Veres, Z., and Stadtman, T.C. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 6345-6348.
3. **Synthesis of 5-methylaminomethyl-2-selenouridine in tRNAs: ^{31}P NMR studies show the labile selenium donor synthesized by the *selD* gene product contains selenium bonded to phosphorus.**
Veres, Z., Tsai, L., Scholz, T.D., Politino, M., Balaban, R.S., and Stadtman, T.C. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 2975-2979.
4. **Monoselenophosphate: synthesis, characterization, and identity with the prokaryotic biological selenium donor, compound SePX.**
Glass, R.S., Singh, W.P., Jung, W., Veres, Z., Scholz, T.D., and Stadtman, T.C. (1993) *Biochemistry* **32**, 12555-12559.
5. **A purified selenophosphate-dependent enzyme from *Salmonella typhimurium* catalyzes the replacement of sulfur in 2-thiouridine residues in tRNAs with selenium.**
Veres, Z., and Stadtman, T.C. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 8092-8096.
6. **Selenophosphate synthetase. Enzyme properties and catalytic reaction.**
Veres, Z., Kim, I.Y., Scholz, T.D., and Stadtman, T.C. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 10597-10603.
7. ***Escherichia coli* mutant SELD enzymes. The cysteine 17 residue is essential for selenophosphate formation from ATP and selenide.**
Kim, I.Y., Veres, Z., and Stadtman, T.C. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 19650-19654.
8. **Biochemical analysis of *Escherichia coli* selenophosphate synthetase mutants. Lysine 20 is essential for catalytic activity and cysteine 17/19 for 8-azido-ATP derivatization.**
Kim, I.Y., Veres, Z., and Stadtman, T.C. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 27020-27025.
9. **Selenophosphate: Synthesis, properties and role as biological selenium donor.**
Stadtman, T.C., Veres, Z., and Kim, I.Y. In: Torriani-Giorini, A., Yagil, E., Silver, S. (Eds.) *Phosphate in microorganism: Cellular and molecular biology* pp. 109-111, Am. Soc. Microbiol., Washington, DC 1994.

A TÉZISEK TÉMAKÖRÉHEZ KÖZVETLENÜL NEM KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK

1. **Contribution to physiological properties of poly(N-vinylpyrrolidone-alt-maleic acid), toxicity and hemagglutination tests.**

- Azori, M., Szinai, I., Veres, Z., Pató, J., Ötvös, L., Tüdös, F. (1990) *J. Bioact. Compat. Polym.* **5**, 305-9
2. **In vitro and in vivo metabolism of anti-herpes agent 5-(2-chloroethyl)-2'-deoxyuridine.**
Szinai, I., Veres, Z., Ganzler, K., Hegedüs-Vajda, J., De Clercq, E. In: Reid E, Wilson JD (eds.) In: *Analysis of Drugs and Metabolites including Anti-infective Agents* pp. 219-220 Royal Society of Chemistry, Cambridge 1990
 3. **Differential effects of 2,2'-anhydro-5-ethyluridine, a uridine phosphorylase inhibitor, on the antitumor activity of 5-fluorouridine and 5-fluoro-2'-deoxyuridine.**
Igo, M., Nishikata, K., Nakajima, Y., Szinai, I., Veres, Z., Szabolcs, A., De Clercq, E. (1990) *Biochem. Pharmacol.* **39**, 1247-53
 4. **The effect of the 3'-OH group on the conformation and binding ability of anhydropyrimidine nucleosides to uridine phosphorylase.**
Veres, Z., Neszmélyi, A., Szabolcs, A., Kiss, A.I., Dénes, G. (1991) *Arch. Biochem. Biophys.* **286**, 1-5
 5. **Metabolism of anti-herpes agent 5-(2-chloroethyl)-2'-deoxyuridine in mice and rats.**
Szinai, I., Veres, Z., Ganzler, K., Hegedüs-Vajda, J., De Clercq, E. (1991) *Eur. J. Drug. Metab. Pharmacokinet.* **16**, 129-36
 6. **cis-trans-Isomerization of [E]-5-(2-bromovinyl)-2,2'-anhydrouridine in vivo in rats.**
Szinai, I., Veres, Z., Szabolcs, A., Gács-Baitz, E., Újszászy, K., Dénes, G. (1991) *Xenobiotica* **21**, 359-6
 7. **Human drug metabolizing enzymes. I. Oxidative enzymes.**
Vereczkey, L., Monostory, K., Veres, Z. *Acta Pharm. Hung.* (1998) **68**, 276-83
 8. **Glucuronidation of thyroxine in primary monolayer cultures of rat hepatocytes: in vitro induction of UDP-glucuronosyltransferases by methylcholanthrene, clofibrate, and dexamethasone alone and in combination.**
Jemnitz, K., Veres, Z., Monostory, K., Vereczkey, L. *Drug Metab. Dispos.* (2000) **28**, 34-7
 9. **Effect of phenobarbital and spironolactone treatment on the oxidative metabolism of antipyrine by rat liver microsomes.**
Szakács, T., Veres, Z., Vereczkey, L. *Pol. J. Pharmacol.* (2001) **53**, 11-19
 10. **Effect of α -methyl dopa on pentoxyresorufin O-dealkylation in liver microsomes from rats treated with phenobarbital.**
Veres, Z., Szakács, T., Vereczkey, L. *Arch. Biochem. Biophys.* (2001) **391**, 59-64

A kandidátusi értekezés benyújtása óta megjelent 19 cikkre vonatkozó összesített impakt faktor: 83,459.

Az összes idegen idézet száma: 197

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetet mondok az MTA Központi Kémiai Kutató Intézet és utódja az MTA Kémiai Kutatóközpont Kémiai Intézet mindenkori igazgatóságának azért, hogy munkámat támogatta, és a disszertáció megszületését lehetővé tette. Szakmai gondolkodásmódom fejlesztésében nagy szerepet játszott Dénes Géza akadémikus, amiért köszönettel tartozom.

Köszönetemet fejezem ki Dr. Thressa C. Stadtmannak, akinek szakmai támogatása nélkül a disszertáció nem készülhetett volna el.

Köszönet illeti mindazokat, akik a disszertációban bemutatott eredmények eléréséhez munkájukkal, tanácsaikkal közvetlenül hozzájárultak:

Dr. Robert S. Balaban
Dr. Richard S. Glass és csoportja
Dr. Ick Y. Kim
Dr. Michael Politino
Dr. Thomas D. Scholz
Dr. Lin Tsai